[Aus der Landwirtschaftlichen Forschungsanstalt Büntehof, Hannover-Kirchrode
(Direktor: Prof. Dr. E. Welte)]

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von Mikroorganismenreinkulturen in der Rhizosphäre

G. Trolldenier

Mit einer Tafel

Wenn auch die intensive mikrobielle Tätigkeit im Bereich der Rhizosphäre seit langem bekannt ist, stieß ihre mikrophotographische Darstellung bisher auf methodische Schwierigkeiten. Zwar gelang es, durch Verwendung von Aufwuchsplatten die in der näheren Umgebung von Wurzelhaaren befindlichen Mikroorganismen zu beobachten, die eigentliche Wurzeloberfläche entzog sich aber der Betrachtung, da die Wurzeln beim Entnehmen der Aufwuchsplatten im Boden verbleiben. Dieser Schwierigkeit suchte man durch Auflichtmikroskopie zu begegnen, wobei die Wurzeln durch Fenster kleiner Wachstumskammern (LINFORD 1940, 1942) oder an der Oberfläche von Bodenkrümeln (ZVYAGINTSEV 1962) beobachtet wurden. Die Fluorochromierung mit dem Farbstoff Acridinorange hat das Studium der allgemeinen Bodenmikroflora sehr erleichtert (LEHNER u. NOWAK 1957, 1959). Die Ausdehnung der Fluoreszenzmikroskopie im Durchlicht auf die Darstellung der Rhizosphärenmikroflora ist in eigenen Untersuchungen aufgezeigt worden (TROLLDENIER 1965 a u. b). An Wurzeldünnschnitten, bei denen nur die Wurzelepidermis präpariert wurde, konnte die Mikroflora der Wurzeloberfläche sichtbar gemacht und so ihre Erscheinungsform und Vermehrung mikroskopisch erforscht werden.

In der vorliegenden Mitteilung soll das Leistungsvermögen dieser Methodik an den Wuchsformen verschiedener Mikroorganismen in der Rhizosphäre bei Pflanzen in Sterilkultur gezeigt werden.

Methodik

Rotkleesamen wurde zum Zwecke der Oberflächensterilisation 45 Min. lang mit 15proz. Wasserstoffperoxid behandelt. Nach mehrmaligem Waschen mit sterilem Wasser wurden die Samen auf einem Fleischextrakt-Pepton-Agar zur Überprüfung der Sterilität zum Keimen gebracht. Die Keimlinge wurden dann in die Aufschwemmung einer Reinkultur von verschiedenen Bakterien getaucht und nach Überführung in Röhrchen auf Schrägagar, der mit den erforderlichen Mineralsalzen versetzt war, kultiviert. Die auf der Agaroberfläche entlang wachsenden Wurzeln wurden nach etwa einer Woche entnommen und präpariert. Die Methodik der Färbung mit Acridinorange und die Herstellung der Wurzeldünnschnitte wurde an anderer Stelle ausführlich beschrieben (TROLLDENIER 1965 a und b).

Ergebnisse

Wegen der Begrenzung in der Zahl der Abbildungen kann nur das Wachstum und die Erscheinungsform einiger weniger Bodenbakterien an der Wurzeloberfläche besprochen werden.

Eine starke Vermehrung in der Rotkleerhizosphäre ist bei dem an Rotklee knöllchenbildenden *Rhizobium trifolii* (Abb. 1, Vergr. 100fach) zu beobachten. Die Epidermiszellen und Wurzelhaare sind deutlich zu erkennen. Sie sind mit grün fluoreszierenden Bakterien dicht besetzt.

Die Beimpfung mit *Sarcina flava* führte dagegen nur an einigen Stellen der Wurzeloberfläche zur Bildung von Kolonien. Abb. 2 (Vergr. 100fach) zeigt in der Mitte des Bildes zwei Kolonien in der typischen paketartigen Wuchsform, wobei eine von beiden an einem Wurzelhaar anhaftet. Die anderen in der Aufsicht zu sehenden Wurzelhaare sind frei von Organismen.

Nach Impfung mit *Bacillus megaterium* fanden sich auf der Wurzeloberfläche viele Einzelbakterien verstreut. Die Epidermiszellen sind wiederum deutlich erkennbar (Abb. 3, Vergr. 100fach).

Geringe Ausbreitung fand *Bacillus mycoides* in der Rhizosphäre. Wie aus Abb. 4 (Vergr. 200fach) ersichtlich, waren im Bereich der Wurzelhaare nur wenige teilweise in kurzen Ketten vereinte Zellen dieses Organismus anzutreffen.

Ähnlich verhielt sich *Bacillus asterosporus*, von dem nur wenige Kolonien aufgefunden wurden. Abb. 5 (Vergr. 143fach) zeigt derartige Kolonien, wie sie zwischen den Wurzelhaaren lose hafteten.

Eine *Mycobacterium*-Species bildete an einigen Stellen auf der Wurzeloberfläche dichte Kolonien. Abb. 6 (Vergr. 286fach) zeigt Mykobakterien einem Wurzelhaar aufsitzend.

In Sterilkultur fanden sich nur einzelne Kolonien von *Azotobacter chroococcum* an den Wurzelhaaren. Die in Abb. 7 (Vergr. 143fach) zu sehende Kolonie umschließt das Wurzelhaar. Die Einzelindividuen sind gut zu erkennen.

Sehr kräftig entwickelte sich *Pseudomonas fluoreszens*. Sowohl an Wurzelhaaren (Abb. 8) (Vergr. 286fach) als auch auf der Wurzeloberfläche fanden sich Mikrokolonien und Einzelbakterien.

Die stärkste Vermehrung erfolgte durch ein nicht identifiziertes Bakterium. Es bildete in Reinkultur um Wurzelhaare und Wurzeloberfläche einen dichten Bakterienrasen. Die Kolonien dieses Bakteriums erstreckten sich häufig in der Längsrichtung der Wurzel (Abb. 9) (Vergr. 286fach), oder es waren Mikrokolonien gleichmäßig über die ganze Wurzel verteilt (Abb. 10) (Vergr. 286fach).

Diskussion

Die unterschiedliche Besiedlung der Rhizosphäre durch die geprüften Bakterienarten bestätigt frühere Keimzählungsergebnisse. Es fanden sich für *Bacillus mycoides* geringe, für *Pseudomonas fluoreszens*, Rhizobien und die Gesamtmikroflora (nach Beimpfung mit Bodenfiltrat) hohe Bakterienzahlen in der Rhizosphäre von Rotklee (Welte u. Trolldenier 1963). Die Keimzahlbestimmungen an dem gleichen Pflanzenmaterial, das auch zur fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung gelangte, entsprachen der mikroskopisch festgestellten Häufigkeit der Bakterien.

Eine „künstliche" Rhizosphäre an steril kultivierten Pflanzen nach Beimpfung mit Reinkulturen verschiedener Mikroorganismen hat schon Stille (1938) herge-

stellt. Beträchtliche Unterschiede der Vermehrung einzelner Organismen an Wurzeln in Sterilkultur sind desgleichen von METZ (1955) und STOLP (1952) beobachtet worden.

Die Sterilkultur mit Reinkulturen von Mikroorganismen bietet eine Möglichkeit, die Vermehrung spezifischer Organismen an den Wurzeln direkt zu verfolgen. Ein Erkennen einzelner Arten der Rhizosphärenmikroflora ist auf wenige Ausnahmen beschränkt. Es ist zu hoffen, daß durch weiteren Ausbau der Immunofluoreszenzfärbung, mit der SCHMIDT u. BANKOLE (1962, 1963) *Aspergillus flavus* an Aufwuchsplatten im Boden direkt nachwiesen, die verschiedenen an der Besiedlung der Rhizosphäre beteiligten Mikroorganismen direkt bestimmbar werden.

Zusammenfassung

Steril angezogene Pflanzen wurden mit Reinkulturen verschiedener Bodenbakterien beimpft. Von diesen Pflanzen wurden Wurzeldünnschnitte nach Anfärbung mit Acridinorange fluoreszenzmikroskopisch im Durchlicht untersucht. An Hand von Abbildungen werden die unterschiedlichen Erscheinungsformen und die Verbreitung der Bakterien besprochen.

Summary

Plants cultivated under aseptic conditions were inoculated with different pure cultures of soil bacteria. From these plants thin sections of the roots stained with acridineorange were studied in transmitted fluorescent light. By means of pictures, the different forms of appearence and distribution of bacteria are discussed.

Literatur

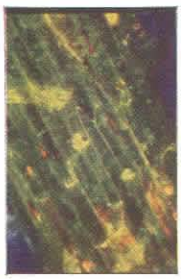
LEHNER, A. und W. NOWAK, Bakteriologische Bodenuntersuchung mit Hilfe von Acridinorange nach STRUGGER. Zbl. Bakt. II **110**, 349—360 (1957). — Dies., Neuere Ergebnisse des Direktnachweises von Bakterien im Boden mittels der kombinierten Aufwuchs-Fluorochromierungsmethode. Zbl. Bakt. II **113**, 32—34 (1959). — LINFORD, M. B., A miniature root-observation box. Phytopath. **30**, 348—349 (1940). — Ders., Methods of observing soil flora and fauna associated with roots. Soil Sci. **53**, 93—103 (1942). — METZ, H., Untersuchungen über die Rhizosphäre. Arch. Mikrobiol. **23**, 297—326 (1955). — SCHMIDT, E. L., und R. O. BANKOLE, Detection of *Aspergillus flavus* in soil by immunofluorescent staining. Science **136**, 776—777 (1962). — Dies., The use of fluorescent antibody with the buried slide technique. Soil Organisms, Proc. Coll. on Soil Fauna, Soil Microflora and their Relationships, Oosterbeck, Netherlands, 197—203 (1963). — STILLE, B., Untersuchungen über die Bedeutung der Rhizosphäre. Arch. Mikrobiol. **9**, 477—485 (1938). — STOLP, H., Beiträge zur Frage der Beziehungen zwischen Mikroorganismen und höheren Pflanzen. Arch. Mikrobiol. **17**, 1—29 (1952). — TROLLDENIER, G., Anwendung der Fluoreszenzmikroskopie für die Rhizosphärenforschung. Zeiss-Informationen, April 1965. — Ders., Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Rhizosphäre. Landwirtsch. Forsch. 19. Sonderh. (im Druck). — WELTE, E., und G. TROLLDENIER, Einfluß von Mikrofloren verschiedener Böden und von Bakterienreinkulturen auf das Pflanzenwachstum. Arch. Mikrobiol. **47**, 42—56 (1963). — ZVYAGINTSEV, D. V., Rhizosphere microflora as studied by fluorescent microscopy in reflected light. Microbiologija (Moskau, Transl.) **31**, 88—91 (1962).

Anschrift des Verfassers:

Dr. G. Trolldenier, Landwirtschaftliche Forschungsanstalt Büntehof, 3 Hannover-Kirchrode, Bünteweg 8

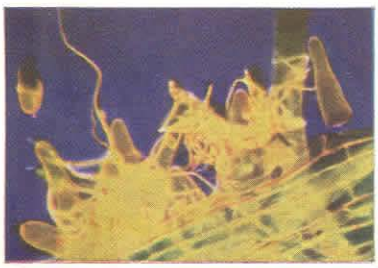
1

2



3

4



5

6

7

8

9

10